



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Unravelling vascular tumors : combining molecular and computational biology

IJzendoorn, D.G.P. van

Citation

IJzendoorn, D. G. P. van. (2020, January 16). *Unravelling vascular tumors : combining molecular and computational biology*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/82754>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/82754>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/82754> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: IJzendoorn, D.G.P. van

Title: Unravelling vascular tumors : combining molecular and computational biology

Issue Date: 2020-01-16

Chapter 11

Nederlandse samenvatting

Vaattumoren vormen een groep tumoren met als overeenkomst dat ze allemaal endotheliale differentiatie laten zien. Zowel intermediaire als kwaadaardige vaattumoren komen in de weke-delen of in de botten voor. Een grote uitdaging bij het bestuderen van deze tumoren is dat tot op heden goede modellen ontbraken om deze tumoren in het laboratorium te kunnen bestuderen. Dit proefschrift beschrijft een aantal geschikte tumor-modellen. Van technieken uit de bioinformatica is gebruikgemaakt om nieuwe inzichten te ontwikkelen in het ontstaan van vaattumoren en andere wekedelentumoren en de behandeling daarvan. De methoden die in dit proefschrift voor het modelleren van vaattumoren zijn beschreven kunnen in de toekomst wellicht ook gebruikt worden voor andere tumoren waarvoor nog geen goede modellen beschikbaar zijn. Dit proefschrift bestaat uit drie onderdelen: diagnostiek en behandeling, tumormodellen, en bioinformatica. **Hoofdstuk 1** introduceert deze drie onderdelen.

11.1 Diagnostiek en behandeling

Verschillende genetische veranderingen kunnen ten grondslag liggen aan het ontstaan van vaattumoren. De meeste vaattumoren zijn gekenmerkt door gebalanceerde translocaties die kunnen ontstaan wanneer er twee breuken in het DNA optreden en het reparatiemechanisme van de cel de verkeerde uiteinden aan elkaar bevestigt. De samensmelting van de genen die gelokaliseerd zijn op de breukpunten kunnen dan leiden tot tumorvorming. Voorbeelden van vaattumoren die ontstaan door translocaties zijn epithelioid hemangioom, epithelioid hemangioendothelioom en pseudomyogeen hemangioendothelioom. **Hoofdstuk 2** is een samenvatting van wat bekend is over de genetische veranderingen, signaaltransductieroutes, epidemiologie en histopathologie van vaattumoren van het bot. Doordat er toenemende kennis is over de moleculaire veranderingen die ten grondslag liggen aan deze vaattumoren, wordt de diagnostiek steeds nauwkeuriger. De diagnose wordt gesteld door gebruik te maken van conventionele histologie aangevuld met immunohistochemie waarmee zelfs moleculaire veranderingen gedetecteerd kunnen worden. In de klinische praktijk wordt bijvoorbeeld gebruik gemaakt van immunohistologische markers zoals FOSB, TFE3 en CAMTA1; de overexpressie van deze eiwitten is een indicatie voor de aanwezigheid van een specifieke translocatie. In de nabije toekomst zullen waarschijnlijk nieuwere technieken zoals ‘next-generation sequencing’ een belangrijke rol gaan spelen in de diagnostiek van vaattumoren.

Hoofdstuk 3 beschrijft een nieuwe translocatie die wij vonden in epithelioid hemangioom door met ‘next-generation sequencing’ het genetisch materiaal van drie epithelioid hemangiomen te analyseren. ‘Next-generation sequencing’ is een techniek waarmee de sequentie van de nucleotiden van meerdere DNA-moleculen tegelijk kan worden bepaald,

waardoor uiteindelijk de gehele DNA-sequentie van een tumor achterhaald wordt. De sequentie van het RNA kan worden bepaald door RNA eerst om te zetten in cDNA. Op deze manier werd in drie tumoren een translocatie van het *FOS*-gen gevonden; in alle gevallen lag het breekpunt halverwege het vierde exon van *FOS* en dat resulteerde in een vervroegd stopcodon in het *FOS*-gen. Het epitheloid hemangioom heeft als kenmerk dat het zich in het bot vaak multifocaal presenteert. In de verschillende tumorhaarden van patiënten werden identieke translocaties gevonden waardoor duidelijk werd dat de verschillende localisaties aan elkaar gerelateerd waren en dat de tumor dus locoregionaal verspreid was en niet per toeval op meerdere plekken tegelijk was ontstaan bij dezelfde patiënt.

In **hoofdstuk 4** wordt een casus beschreven van een patiënt met inoperabel pseudomyoëen hemangioendotheliom. Bij deze patiënt had de tumor zich verspreid in het hoofdhalsg gebied en de tumor reageerde niet op behandeling met docetaxel. In het kader van een fase I klinische trial werd de patiënt met telatinib, een tyrosine kinase remmer, behandeld. Dit resulteerde in een volledige remissie van de tumor. Het werkingsmechanisme van telatinib is onderzocht met behulp van een cellijnmodel voor pseudomyoëen hemangioendotheliom. Voor dit cellijnmodel werd een verkort FOSB-eiwit tot overexpressie gebracht in endotheelcellen, de meest waarschijnlijke cel van oorsprong van deze tumor. Het verkorte FOSB-eiwit werd gebruikt om de *SERPINE1-FOSB*-fusie na te bootsen die gevonden wordt in pseudomyoëen hemangioendotheliom. De hypothese was dat het eerste deel van deze fusie, *SERPINE1*, zorgt voor de hoge expressie van het eiwit maar geen eiwitverandering veroorzaakt, en dat FOSB door de fusie de eerste 48 amino zuren verliest. Met dit cellijnmodel konden we laten zien dat PDGFRA en FLT1 (VEGFR1), bekende doelwitten van telatinib, meer tot expressie kwamen door het verkorte FOSB-eiwit. Dit resulteerde in een verminderde groei bij behandeling met telatinib van het cellijnmodel. Deze studie laat het nut zien van het heroriënteren van geneesmiddelen, zeker voor zeldzame tumoren zoals de vaat tumoren waarvoor het ontwikkelen van nieuwe behandelingen niet winstgevend zou zijn.

11.2 Tumormodellen

In **hoofdstuk 5** is de fusie bestudeerd zoals geïdentificeerd in het epitheloid hemangioom, waarvan het effect een verkorting van het FOS-eiwit is (zie hoofdstuk 3). Het FOS-eiwit bleek een alpha-helix in het C-terminale uiteinde te bezitten die voor snelle degradatie van het FOS-eiwit zorgt, zonder daarbij gebruik te maken van ubiquitine (de meest voorkomende manier waarop eiwitten degraderen in de cel). Eiwitdegradatie binnen de cel is belangrijk om signaaltransductie te reguleren. Het verlies van deze alpha-helix

zoals bij epithelioid hemangiomen zorgt dus voor verminderde afbraak van het FOS-eiwit. Dit leidt vervolgens tot hoge activiteit van de AP-1 transcriptie factor, hetgeen dus een belangrijke rol speelt bij het ontstaan van een epithelioid hemangioom.

In **hoofdstuk 6** werd een model voor pseudomyogeen hemangioendothelioom ontwikkeld met behulp van CRISPR/Cas9, een systeem om genetische veranderingen aan te brengen in de cel. Dit systeem bestaat uit twee componenten; het Cas9-eiwit dat door een ‘guide RNA’ naar een locatie op het DNA wordt gebracht waar het een breuk in het DNA veroorzaakt. Twee breuken werden in het DNA van pluripotente stamcellen aangebracht; op chromosomen 7 en 19. Deze breuken werden aangebracht op de exacte locaties waar bij patiënten met pseudomyogeen hemangioendothelioom ook de breukpunten van het fusiegen gevonden worden. Op de breukpunten zijn het *SERPINE1* en *FOSB*-gen gelokaliseerd die het fusiegen vormen. Na het creëren van het fusiegen werden de pluripotente stamcellen naar endotheelcellen gedifferentieerd. Met deze endotheelcellen kon vervolgens onderzocht worden wat het effect van het fusiegen is op endotheelcellen vergeleken met controle-endotheelcellen zonder fusiegen. We vonden dat de verbindingen tussen de cellen minder sterk werden en dat de endotheelcellen met translocatie in muizen meer invasie van deze cellen in omliggend weefsel lieten zien vergeleken met de controle-endotheelcellen. Daarnaast werd met een bioinformatica analyse aangetoond dat de genexpressie van de endotheelcellen met translocatie eigenschappen van pseudomyogeen hemangioendothelioom liet zien.

11.3 Bioinformatica

Steeds meer genetische data gegenereerd door middel van ‘next-generation sequencing’ worden vrij gedeeld in grote publiekelijk toegankelijke databestanden. Een manier om deze grote datasets te analyseren is door middel van gen regulatie netwerken. **Hoofdstuk 7** beschrijft een nieuwe implementatie van het PANDA-algoritme in de Python programmeertaal. Deze implementatie is sneller dan de C++ en R-implementaties door gebruik te maken van snelle matrix berekeningen. Door de hogere snelheid is het mogelijk grotere datasets met meerdere verschillende samenstellingen in korte tijd te analyseren. Door het identificeren van verschillen in genexpressie tussen de verschillende genen kunnen Pearson correlaties tussen genen, geïdentificeerd met het PANDA-algoritme, berekend worden. Om tot een beter resultaat te komen maakt het PANDA-algoritme ook gebruik van bekende transcriptiefactor - gen interacties en bekende eiwit - eiwit interacties bij het berekenen van het genregulatiernetwerk.

In **hoofdstuk 8** werden genexpressiedata van endotheelcellen die verkort *FOS*, *FOSB*, en een leeg controle-plasmide tot expressie brachten, geanalyseerd door middel van netwerk-

analyse. In de controle-cellen vonden we dat *FOS* en *FOSB* hoog tot expressie kwamen na serum stimulatie, wat aangaf dat het AP-1 transcriptiefactorcomplex een belangrijke rol speelt in eerste reactie op deze stimulatie. Epithelioid hemangioom en pseudomyogeen hemangioendothelioom hebben altijd hoge expressie van *FOS* en *FOSB*, vergelijkbaar met de serum gestimuleerde endotheelcellen. De netwerkanalyse liet zien dat *YAP1* - een onderdeel van de HIPPO-siginaaltransductieroute - gereguleerd werd door AP-1 activatie van de transcriptiefactor. Epithelioid hemangioendothelioom wordt gekarakteriseerd door de fusiegenen *WWTR1-CAMTA* of *YAP1-TFE3*, die beiden verbonden zijn met de HIPPO-siginaaltransductieroute. De gevonden verbinding tussen AP-1 activatie en de HIPPO-siginaaltransductieroute zou een verklaring kunnen zijn voor de overeenkomsten tussen epithelioid hemangioom en epithelioid hemangioendothelioom.

Een andere mogelijk manier om genexpressie te analyseren komt voort uit ‘machine learning’. ‘Machine learning’ speelt een steeds grotere rol in diverse disciplines en op uiteenlopende terreinen, waarbij de bekendste voorbeelden het herkennen van spraak en beelden zijn. Dezelfde ‘machine learning’ algoritmes kunnen ook gebruikt worden om genexpressie data te analyseren. In **hoofdstuk 9** werd ‘machine learning’ toegepast op de genexpressie dataset van ‘The Cancer Genome Atlas’ (TCGA) met 206 wekedelensarcomen. Eerst identificeerden we genen die gebruikt kunnen worden om de verschillende wekedelen sarcomen te diagnosticeren welke microscopisch erg op elkaar kunnen lijken. Voorbeelden van morfologisch zeer lastig te onderscheiden tumoren zijn MPNST en synoviosarcoom waarbij de expressie van *NEURL1* en *NPAS1* gebruikt kunnen worden om onderscheid te maken. Daarnaast hebben we genen opgespoord waarvan de expressie een houvast kan bieden bij het voorspellen van de prognose. Zo konden we bijvoorbeeld bevestigen dat een immunohistochemische kleuring voor HMMR een indicatie kan geven van de prognose voor leiomyosarcoom patiënten (waarbij hoge expressie een slechte prognose betekent). Ook zochten we naar nieuwe therapieën voor wekedelensarcomen door middel van een netwerkanalyse. Met deze analyse konden we laten zien dat HDAC blokkerende medicatie een mogelijk therapie voor het leiomyosarcoom kan zijn, een bevinding die in cellijnen kon worden gevalideerd.

In dit proefschrift zijn de volgende bevindingen uniek en dragen bij aan beter begrip van vaattumoren en andere wekedelensarcomen. Voor epithelioide hemangiomen is een nieuwe translocatie beschreven die verklaart waardoor het *FOS*-eiwit een langere levensduur krijgt. Voor een patiënt met pseudomyogeen hemangioendothelioom die na een behandeling met telatinib volledig genezen bleek te zijn, is het mogelijke werkingsmechanisme van telatinib in pseudomyogene hemangioendotheliomen opgehelderd. Voor pseudomyogeen hemangioendothelioom hebben we een nieuw cellijn model ontwikkeld. Met CRISPR/Cas9 kon de karakteristieke translocatie in het DNA van endotheelcellen aange-

bracht worden waarmee meerdere aspecten van pseudomyogeen hemangioendotheloom gesimuleerd kunnen worden. In dit proefschrift wordt veelvuldig gebruik gemaakt van bioinformatica om de vaattumoren maar ook andere weke-delen sarcomen beter te begrijpen en te zoeken naar nieuwe behandelingen. Daarbij is gebruik gemaakt van genregulatie netwerken en machine learning, bioinformatica methoden die dit veld van biomedisch onderzoek drastisch zullen vernieuwen.